WELTORGANISATION FUR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:

33/04, 31:40) (A61K 33/04, 31:495)

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:

WO 99/64018

A61K 33/04, 31/495, 31/40 // (A61K

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

16. Dezember 1999 (16.12.99)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP99/03771

A1

(22) Internationales Anmeldedatum:

31. Mai 1999 (31.05.99)

(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

(30) Prioritätsdaten:

198 25 746.5

9. Juni 1998 (09.06.98)

DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BIOSYN ARZNEIMITTEL GMBH [DE/DE]; Schorndorfer Strasse 32, D-70734 Fellbach (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): STIEFEL, Thomas [DE/DE]; Steinkopfstrasse 22, D-70184 Stuttgart (DE). RÖHRER, Helmut [DE/DE]; Isenberg 19, D-79206 Breisach (DE).

(74) Anwalt: GRÜNECKER, KINKELDEY, STOCKMAIR & SCHWANHÄUSSER; Maximilianstrasse 58, D-80538 München (DE).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: COMBINATION OF COMPOUNDS CONTAINING SELENIUM AND CYTOSTATIC AGENTS

(54) Bezeichnung: KOMBINATION VON SELEN-HALTIGEN VERBINDUNGEN MIT ZYTOSTATIKA

(57) Abstract

The invention relates to the use of selenium and/or a derivative thereof in conjunction with one or more cytostatic agents. The aim of the invention is to intensify the effect of anti-tumour agents and to provide these agents in a suitable form of administration. To this end, selenium and/or at least one selenium compound is used to intensify the effect of one or more cytostatic agents. This combination results in a synergistic, i.e., superadditive reinforcement of the effect. The invention also relates to a kit containing selenium and/or at least one selenium compound and one or more cytostatic agents, in the form of a combination preparation for use in cytostatic therapy. The invention can be used effectively against various types of tumour, however especially against large and small-cell bronchial carcinomas, glandular carcinomas, pancreatic carcinomas, prostate carcinomas and hypernephromas.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Verwendung von Selen und/oder einem Derivat davon in Kombination mit einem oder mehreren Zytostatika. Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, eine Möglichkeit anzugeben, bei antitumoralen Wirkstoffen eine Wirkungssteigerung zu erzielen, sowie diese Wirkstoffe in geeigneter Darreichungsform bereitzustellen. Diese Aufgabe wird durch die Verwendung von Selen und/oder mindestens einer Selenverbindung zur Wirkungssteigerung eines oder mehrerer Zytostatika gelöst. Diese Kombination führt zu einer synergistischen, d.h. überadditiven Wirkungsverstärkung. Weiterhin wird in der vorliegenden Erfindung ein Kit bereitgestellt, der Selen und/oder mindestens eine Selenverbindung und ein oder mehrere Zytostatika als Kombinationspräparat für die zytostatische Therapie enthält. Die vorliegende Erfindung kann wirksam gegen verschiedene Tumorzellarten eingesetzt werden, im besonderen jedoch gegen groß- und kleinzellige Bronchialkarzinome, Adenokarzinome, Pankreaskarzinome, Prostatakarzinome und Hypernephrome.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

A 1	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AL AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AT	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AU		GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
AZ	Aserbaidschan	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BA	Bosnien-Herzegowina	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BB	Barbados	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BE	Belgien	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BF	Burkina Faso			ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BJ	Benin	ΪĒ	Irland	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
BY	Belarus	IS	Island		Mexiko	QD.	Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX		UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL '	Niederlande		
СН	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	zw	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
cz	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI.	Liechtenstein	SD	Sudan -		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		
L EE	Cationa			-	- -		

WO 99/64018 PCT/EP99/03771

Kombination von Selen-haltigen Verbindungen mit Zytostatika

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Verwendung von Selen und/oder einem Derivat davon in Kombination mit einem Zytostatikum oder einer Mischung von Zytostatika.

Das chemische Element Selen ist ein für Menschen und Tiere essentielles Spurenelement, das vor allem oxidative Prozesse sowie den Thyroxinmetabolismus beeinflußt. Beim Menschen konnte nachgewiesen werden, daß das Enzym Glutathionperoxidase und das im Plasma auftretende Selenoprotein P jeweils Selen in Form der Aminosäure Selenocystein enthalten. Die Selen-haltige Glutathionperoxidase ist Bestandteil des antioxidativen Schutzsystems der Säugetierzelle. In Gegenwart ausreichender Mengen an Substrat, d.h. reduziertem Glutathion, konvertiert die Glutathionperoxidase eine Vielzahl verschiedener Hydroperoxide zu entsprechenden Alkoholen. Es konnte gezeigt werden, daß die Integrität zellulärer und subzellulärer Membranen entscheidend von der Intaktheit des Glutathionperoxidase-Systems abhängt. Selen als Bestandteil der Glutathionperoxidase kann die Lipidperoxidationsrate und daraus resultierende Membranschäden senken.

In Tieren wurde kürzlich die Typ-I-lodthyronin-5'-Deiodase als Selen-haltiges Enzym charakterisiert. Die lodthyronin-Deiodase wandelt auch beim Menschen in der Schilddrüse, Leber und Niere Thyroxin (T₄) in Triiodthyronin (T₃), das aktive Schilddrüsenhormon, um. Bei Selenmangel, z.B. bei Phenylketonurie und zystischer Fibrose, konnten erhöhte T₄-Werte bei gleichzeitig reduziertem T₃-Spiegel nachgewiesen werden. Durch die Gabe von Natriumselenit (Na₂SeO₃) normalisiert sich der Schilddrüsenstoffwechsel wieder.

Als weiteres selenabhängiges Enzym wurde kürzlich eine humane Thioredoxinreduktase aus Lungenzellen beschrieben, die Selen als Ko-Faktor enthält (Tamura und Stadtman, 1996, Biochemistry, Proc. Natl. Acad. Sci., 93: 1006-1011). Das Enzym konnte bislang aus T-Zellen, Lungengewebe und Plazenta isoliert werden (Gladyshev et al., 1996, Biochemistry, Proc. Natl. Acad. Sci., 93: 6146-6151). Das selenabhängige Enzym Thioredoxinreduktase reduziert Thioredoxin. Thioredoxin wird bei einer Reihe von Tumoren überexprimiert, und einige experimentelle Studien haben gezeigt, daß Thioredoxin zum

Wachstum und zur malignen Transformation einiger humaner Krebszellen beiträgt. Das Enzym Thioredoxinreduktase spielt deshalb eine Rolle in der Regulation des Wachstums von Normal- und Krebszellen.

Die pathophysiologische Relevanz der Selen-abhängigen Reaktionen ist durch Beobachtung von Selenmangelerscheinungen bei Menschen und Tieren belegt. Ein Mangel an diesem Spurenelement verstärkt oxidativ oder chemisch induzierte Leberschäden sowie die Toxizität von Schwermetallen wie Quecksilber und Cadmium.

Als Selenmangelerscheinungen werden beim Menschen die Keshan-Krankheit, eine endemisch auftretende Kardiomyopathie, und die sogenannte Kaschin-Beck-Krankheit beschrieben, eine ebenfalls endemisch auftretende Osteoathropathie mit starken Verformungen der Gelenke. Klinisch manifestierter Selenmangel wurde auch als Folge von langandauernder parenteraler Ernährung und von bilanzierten Diäten beobachtet. Dabei traten vor allem Kardiomyopathien und Myopathien der Skelettmuskulatur sowie eine Verschiebung des T₃/T₄-Verhältnisses auf.

Epidemiolische Untersuchungen deuten auf eine inverse Korrelation zwischen Blut-Selen-Spiegel und der Inzidenz von Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Kardiomyopathien, Arteriosklerose, Myocardinfarkt) sowie von Tumorerkrankungen, besonders des Verdauungstraktes, der Brust und der Leber hin. Erniedrigte Plasma-Selenspiegel können bei Patienten mit Niereninsuffizienz sowie bei gastrointestinalen Erkrankungen vorliegen. Ein Selenmangel kann durch einen erniedrigten Vollblut- oder Plasma-Selen-Spiegel und durch erniedrigte Glutathionperoxidase-Aktivität in Vollblut, Plasma oder Thrombozyten nachgewiesen werden.

Selensubstitution bei Mangelerscheinungen aktiviert Reaktionen der Immunabwehr, insbesondere die unspezifischen, zellgebundenen und humoralen Reaktionen. Die Selenhaltige Glutathionperoxidase beeinflußt den Leukotrien-, Thromboxan- und Prostacyclin-Stoffwechsel. Im folgenden sind die immunmodulatorischen Effekte von Selen-haltigen Verbindungen aufgeführt:

Stimulation der Lymphozyten-Proliferation

- Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen
- Erhöhung der Interleukin-2-Rezeptorexpression
- selektive Senkung der T-Suppressorzellzahl
- Erhöhung der Interferon-γ-Synthese
- allgemeine Senkung der Infektionshäufigkeit

Selen in Form von Selenit (SeO₃²⁻) wird nicht direkt in Proteine eingebaut. Im Blut wird Selenit zuerst hauptsächlich von den Erythrozyten aufgenommen und enzymatisch zu Selenwasserstoff reduziert. Selenwasserstoff dient als zentraler Selen-Pool für die Ausscheidung und für den gezielten Einbau in Selenoproteine. In dieser reduzierten Form wird Selen an Plasmaproteine gebunden, die in die Leber und andere Organe wandern. Der von der Leber ausgehende plasmatische Sekundärtransport in die Glutathionperoxidase-synthetisierenden Zielgewebe geschieht wahrscheinlich in Form eines Selenocystein-haltigen P-Selenoproteins. Der weitere metabolische Verlauf der Selenoprotein-Biosynthese ist bisher nur aus prokaryontischen Modellorganismen bekannt. In diesen wird Selenocystein im Verlauf der Translation spezifisch in die Peptidkette der Glutathionperoxidase eingebaut.

Überschüssiger Selenwasserstoff wird beim Menschen über Methylselenol und Dimethylselenid zum Trimethylselenonium-Ion, dem Hauptausscheidungsprodukt, metabolisiert. Selenit wird nach oraler Applikation vorwiegend aus dem Dünndarm absorbiert. Die intestinale Absorption von Natriumselenit ist nicht homöostatisch reguliert. Sie beträgt in Abhängigkeit von der Konzentration und von Begleitsubstanzen zwischen 44% und 89%, gelegentlich über 90%. Die Aminosäure Cystein fördert die Natriumselenit-Absorption.

Organische Selenverbindungen müssen ebenfalls zuerst in Selenwasserstoff umgewandelt werden, bevor sie für die Synthese von Selenoproteinen zur Verfügung stehen. Das in der Nahrung hauptsächlich enthaltene Selenomethionin kann auch anstelle von Methionin bei der Proteinbiosynthese unspezifisch in nicht selenhaltige Proteine statistisch eingebaut werden.

Die Gesamtmenge an Selen im menschlichen Körper liegt bei einem ausgeglichenen Selen-Haushalt zwischen 4 mg und 20 mg. Die Ausscheidung von Selen erfolgt beim Menschen je nach applizierter Dosis über den Urin, die Fäzes und über die Lunge. In erster Linie wird Selen in Form der oben erwähnten Trimethylselenonium-lonen renal ausgeschieden.

Beim Menschen wurden akute Selenintoxikationen bisher selten beschrieben. Als Anzeichen einer akuten Überdosierung gelten knoblauchartiger Atemgeruch, Müdigkeit, Übelkeit, Diarrhö und abdominelle Schmerzen. Aus Beobachtungen zur chronischen Toxizität von Selen beim Menschen wurde eine maximale sichere tägliche Aufnahme von Selen von 820 µg abgeleitet, während eine Dosierung von bis zu 550 µg pro Tag auch bei empfindlichen Personen als unbedenklich angesehen wird. Als klinische Anzeichen der endemisch auftretenden Selenose wurden bei einer Studie in China nach täglicher Zufuhr von 3200-6700 µg Selen Haarausfall, Brüchigkeit der Fingernägel, Hautveränderungen und Störungen des Nervensystems beobachtet. Bei verschiedenen Spezies wurde als Symptom der Selenose eine Einschränkung der Reproduktionsfähigkeit aufgrund verringerter Motilität der Spermatozoen beschrieben.

In einer Dosis-Eskalationsstudie wurden bei Tumorpatienten zwischen 10 und 50 mg Selen in Form von Natriumselenit-Pentahydrat infundiert. Innerhalb von 30 Minuten stieg der Plasmaselenspiegel nach Gabe von 10 mg Selen als Natriumselenit von 200 μg/l auf 1200 μg/l. Nach 8 und 16 Stunden war das Plasmaselen auf 770 bzw. 430 μg/l abgesunken. Nach 24 Stunden hatte der Plasmaselenspiegel wieder seinen Ausgangswert erreicht. Die gastro-intestinale Toxizität trat ab etwa 20 mg Selen als Natriumselenit auf und war nach Absetzen des Präparates reversibel (Röhrer H., 1989, Erfahrungsheilkunde 38: 10a, 761).

Als Gegenmaßnahmen im Falle einer Vergiftung kommen Magenspülung, erzwungene Diurese oder hochdosierte Vitamin C-Gaben in Frage. Bei extremer Überdosierung (1000-10000-fach) kann versucht werden, das Selenit durch Dialyse zu eliminieren.

Das Spurenelement Selen wird von Menschen vorwiegend durch den Verzehr von Eigelb, Fisch und Fleisch, besonders vom Huhn und Schwein, sowie Innereien aufgenommen. Die minimale notwendige Selenzufuhr des Menschen hängt ab von der che-

mischen Form des aufgenommenen Elementes und von der Zusammensetzung der Diät, in der es vorliegt. In China wurde experimentell eine Menge von 15-20 µg Selen pro Tag als ausreichend ermittelt, um vor endemischen Selenmangelkrankheiten zu schützen. Der National Research Council (NRC) der USA empfiehlt für Männer eine tägliche Zufuhr von 70 µg Selen, für Frauen 55 µg Selen. Der NRC stufte früher (bis 1989) Tagesmengen von 50-200 µg Selen als angemessen und unbedenklich ein. Die deutsche Gesellschaft für Ernährung empfiehlt 20-100 µg Selen täglich.

Die tägliche durchschnittliche Selenzufuhr, zu 2/3 gedeckt durch die Zufuhr von tierischem Eiweiß, liegt in den alten Bundesländern Deutschlands bei 38 µg für Frauen und 47 µg für Männer. Im Gebiet der neuen Bundesländer wurden hingegen Werte von 20-25 µg Selen ermittelt. Diese Zahlen belegen, daß die nutritive Selenzufuhr in Deutschland nicht immer gedeckt ist. Das Risiko einer unzureichenden Versorgung mit Selen besteht besonders in Situationen mit erhöhtem Bedarf (z.B. Schwangerschaft und Stillzeit), bei Personen unter Schwermetall- und Oxidanzienbelastung, bei Patienten mit gastrointestinalen Komplikationen (z.B. chronisch entzündliche Darmerkrankungen) und bei parenteral oder mit besonderen Diäten (z.B. bei Phenylketonurie) ernährten Personen.

Epidemiologische Studien haben gezeigt, daß geringe Selenaufnahme und entsprechend geringe Selen-Blutplasmakonzentration mit einem erhöhten Auftreten verschiedener Krebsarten beim Menschen in Zusammenhang stehen (Glattre et al., 1989, Int. J. Epedemiol., 18:45-49; Knekt et al., 1990; J. Natl. Cancer Inst., 82:864-868; Burney et al., 1997, J. Clin. Nutr., 49:895-900). Es wurde ebenfalls gezeigt, daß Selen in hohen Dosen (10-100 μM) das Wachstum verschiedener Tumorzellen, z.B. bei menschlichen Brustkrebszellen, Eierstockkrebszellen und Darmkrebszellen, in vitro deutlich inhibieren kann (Yan et al., 1991; Biol. Trace Elem. Res., 30:145-162; Chen et al., 1995, FASEB J., 9(3): A159; Nano et al., 1989, Biol. Trace Elem. Res. 20: 31-43; Stewart et al., 1997, Cancer Lett., 117:35-40). Im Gegensatz dazu berichten mehrere Wissenschaftler von einem wachstumsstimulierenden Effekt geringer Mengen an Natriumselenit (0,001-1 μΜ) auf verschiedene Tumorzellen, die unter serumfreien Bedingungen inkubiert würden (Nano et al., 1989, Biol. Trace Elem. Res., 20:31-43; Golczewski und Frenkel, 1989, Biol. Trace Elem. Res., 20:31-43; Golczewski und Frenkel, 1989, Biol. Trace Elem. Res., 20:115-126). Des weiteren wurde beobachtet, daß organische Selenverbindungen eine präventive Wirkung in bezug auf die Tumorentwicklung

von Mammakarzinomen in Mäusen und Ratten ausüben (El-Bayoumy et al., 1995, J. Cell. Biochemistry, Anhang 22: 29-100). Der Mechanismus, durch den Selen die Tumorproliferation bzw. -regression beeinflußt, ist nicht näher bekannt. Es wird jedoch vermutet, daß die Induktion von DNA-Strangbrüchen und Apoptose, welche durch Selen und/oder Selenmetabolite, wie Selenodiglutathion und Hydrogenselenid sowie durch die Bildung von Selenoproteinen, wie Glutathionperoxidase und Thioredoxinreduktase eine wichtige Rolle dabei spielen (Thompson et al., 1994, Carcinogenesis 15:183-186; Wu et al., 1995, Carcinogenesis 16: 1579-1584; Lu et al., 1994, Biochem. Pharmacol., 47:1531-1535; Milner, 1985, Fed. Proc., 44: 2568-2572; Schrauzer, 1992, Biol. Trace Elem. Res., 33:51-62; Gallegos et al., 1997, Cancer Res., 75:4965-4979). So könnte z.B. eine Erhöhung der Thioredoxinreduktase-Aktivität durch Selen die zelluläre Thioredoxinkonzentation senken und daher die Regulation des Wachstums von Krebszellen beeinflussen (Gallegos et al., 1997, Cancer Res., 75: 4965-4979).

In Kombinationsexperimenten wurde beobachtet, daß die Verabreichung geringer Mengen an Selen bzw. Selen-haltigen Verbindungen zusammen mit Zytostatika keine Senkung des antitumoralen Effektes bewirkt, jedoch die durch Zytostatika bedingten Nebenwirkungen, wie Nephrotoxizität oder Kardiotoxizität erheblich zu reduzieren vermag.

Während für einige Krebsarten bereits recht wirksame Therapieverfahren entwickelt werden konnten, - die Mortalitätsrate nach Darmkrebserkrankung konnte z.B. zwischen 1992 bis 1993 um ungefähr 17% gesenkt werden - steht für die überwiegende Mehrheit von Krebsarten bisher noch gar keine oder eine nur sehr unzureichende Therapie zur Verfügung.

Neben der operativen Entfernung des Tumors und der Strahlentherapie gilt die Chemotherapie als das bisher wirksamste Therapieverfahren. Chemotherapeutische Medikamente lassen sich im wesentlichen in die folgenden vier Gruppen einteilen: Antimetabolite, Topoisomerase-Inhibitoren, alkylierende Mittel und Pflanzenalkaloide, wobei die drei erstgenannten Gruppen eine korrekte Replikation der Erbsubstanz verhindern und die letzte Gruppe Mitose-inhibierend wirkt. Bei der Behandlung vor allem solider Tumore reicht die Wirkung der Zytostatika meistens nicht aus, um die Tumore kurativ zu behandeln.

Es ist daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine Möglichkeit anzugeben, bei antitumoralen Wirkstoffen eine Wirkungssteigerung zu erzielen sowie diese Wirkstoffe in geeigneter Darreichungsform bereitzustellen.

Diese Aufgabe wird durch die Verwendung von Selen und/oder mindestens einer Selenverbindung zur Wirkungssteigerung eines Zytostatikums oder einer Mischung von Zytostatika gelöst.

Weiterhin wird die Aufgabe gelöst durch das Bereitstellen eines Kits, umfassend Selen und/oder mindestens eine Selenverbindung und ein Zytostatikum oder eine Mischung von Zytostatika als Kombinationspräparat zur gleichzeitigen, getrennten oder zeitlich abgestuften Anwendung in der zytostatischen Therapie.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Verwendung von Selen und/oder mindestens einer Selenverbindung zur Wirkungssteigerung eines Zytostatikums oder einer Mischung von Zytostatika. Die im folgenden aufgeführten Beispiele demonstrieren, daß in vitro eine gleichzeitige Behandlung mit den oben genannten Komponenten überraschend zu einem deutlichen synergistischen, d.h. überadditiven antitumoralen Effekt führt.

Es werden organische und anorganische Selenverbindungen zur Kombination mit Zytostatika eingesetzt. In einer bevorzugten Ausführungsform wird eine organische Selenverbindung verwendet. Die Verwendung von organischen Selenverbindungen soll dabei der Senkung der Toxizität gegenüber anorganischen Selenverbindungen bei gleicher oder verbesserter antitumoraler Wirksamkeit dienen. Besonders bevorzugt sind die Selenaminosäuren Selenomethionin und Selenocystein sowie die Verbindung Phenylenbis(methylen)selenocyanat sowie Derivate davon (El-Bayonmi et al., 1995, J. Cell. Biochemistry, Anhang 22: 92-100). Die letztgenannte Verbindung inhibiert Thymidinkinase in menschlichen Mammakarzinomzellinien. Des weiteren wurde darüber berichtet, daß diese Verbindung eine Hemmung des Zellwachstums sowie die Induktion des Zelltods durch Apoptose auslösen kann.

Weiterhin wird ein Selenoxid als Selenverbindung bevorzugt, um eine Wirkungssteigerung eines Zytostatikums oder einer Mischung von Zytostatika zu erzielen. In einer be-

sonders bevorzugten Ausführungsform ist die Selenverbindung ein Salz von SeO₂, z.B. das Salz Na₂SeO₃.

Das Zytostatikum, welches zusammen mit Selen bzw. einer Selenverbindung verwendet wird, kann ein Mitose-hemmendes Zytostatikum sein. Beispiele für diese Gruppe sind u.a. Substanzen, wie Vinblastin und Vinorelbin.

Das zusammen mit Selen bzw. einer Selenverbindung verwendete Zytostatikum kann ebenfalls ein Nukleinsäuresynthese-hemmendes Zytostatikum sein, z.B. Methotrexat und Fluoruracil, welche zur Gruppe der Antimetabolite gehören oder der Topoisomerase-Inhibitor Topodecan. mRNA-Syntheseinhibitoren wie Doxorubicin oder alkylierende Mittel, wie Cyclophosphamic und Chlorambucil. In der folgenden Tabelle sind Beispiele verschiedener Zytostatika, geordnet nach ihren Wirkungsmechanismen, aufgeführt, die geeignet sind zur gemeinsamen Verabreichung mit Selenverbindungen. Dabei können ebenfalls Kombinationen mehrerer verschiedener Zytostatika gemeinsam mit Selenverbindungen verwendet werden.

Effekt auf	Wirkmechanismus	Zytostatika-Gruppen und Substanzbeispiele	Dosierungsbereiche
DNS- Bio- Syn- these	Enzyminhibition - Dihydrofolatreduk- tase	Antimetaboliten ⇒ Methotrexat	\Rightarrow 20-40 mg/m ² /d i.v. HD: 12 g/m ²
	ThymidylatsynthaseDNS-PolymeraseRibonukleotidreduktase	 ⇒ 5-FU ⇒ ZD1694 (Tomudex) ⇒ Capecitabin ⇒ Gemcitabin ⇒ Cytosin-Arabinosid ⇒ Hydroxyharnstoff ⇒ 6-Mercaptopurin 	⇒ 500-600 mg/m² i.v oder 2-2,6 g/m² i.v. (24-h-lnf) ⇒ 3 mg/m²/d i.v. ⇒ ca. 500 mg/m²/d p.o. ⇒ 1000-1250 mg/m² i.v ⇒ 200 mg/m²/d i.v. HD: 3 g/m² ⇒ 800-1600 mg/m²/d p.o. ⇒ 100 mg/m²/d p.o.
DNS	Induktion von Strangbrüchen - Zwischenstrang- vernetzung - Interkalation	Alkylanzien Mustargen Estramustinphosphat Melphalan	⇒ 6 mg/m ² ⇒ 480-550 mg/m ² /d p.o. 150- 200 mg/m ² /d i.v. ⇒ 8-10 mg/m ² /d p.o. 15 mg/m ² /d i.v.

:	u 22 co 100 uo 100 u 14 000 000 000 000 000 000 000 000 000 0	Chlorambucil	\Rightarrow 3-6 mg/m ² /d p.o.
		Prednimustin	
		, rearminasuit	\Rightarrow 40 mg/m ² /d p.o. oder 60-100
		Cyclophosphamid	mg/m²/d p.o.
		Cyclophosphamid	⇒ 750-1200 mg/m²/d i.v. oder
			50-100 mg/m²/d p.o.
		166	HD: 2,4 g/m² i.v
		Ifosfamid	\Rightarrow 1500-2000 mg/m ² /d i.v.
		Trofosfamid	\Rightarrow 150-200 mg/m ² /d p.o. initial
			dann 25-100 mg/m²
		Busulfan	\Rightarrow 2-6 mg/m ² /d p.o.
		Treosulfan	\Rightarrow 5-8 g/m ² /d i.v. oder
			1500 mg/m²/d p.o.
		Thiotopa	\Rightarrow 12-16 mg/m ² i.v.
		Thiotepa	$\Rightarrow 100 \text{ mg/m}^2/\text{d i.v.}$
		Carmustin	:
		Lomustin	\Rightarrow 100 mg/m ² p.o.
		Nimustin	\Rightarrow 90-100 mg/m ² i.v.
		Dacarbazin	\Rightarrow 100-200 mg/m ² /d i.v.
		Procarbazin	\Rightarrow 100 mg/m ² /d p.o.
	- Topoisomerasegifte	Topotecan	\Rightarrow 1,5 mg/m ² /d i.v.
		Irinotecan	\Rightarrow 100-350 mg/m ² i.v.
		Platinkomplexe	J.
		Cisplatin	\Rightarrow 20 mg/m ² /d i.v. oder 80-120
			mg/m²/d i.v.
		Carboplatin	⇒ 300-400 mg/m² i.v.
		Oxaliplatin	$\Rightarrow 80-135 \text{ mg/m}^2 \text{ i.v.}$
		Antibiotika (s.u.)	→ 80-135 mg/m 1.v.
		Epipodophyllotoxine	
		Etoposid	100 200
		Teniposid	\Rightarrow 100-200 mg/m ² /d i.v.
			⇒ 20-30 mg/m²/d i.v.
RNS	Blockade der	Antibiotika	
	mRNS-	Aclarubicin	\Rightarrow 25-100 mg/m² i.v.
	Synthese durch In-	Bleomycin	\Rightarrow 10-15 mg/m ² i.v.
	terkalation	Actinomycin D (Dactino-	\Rightarrow 0,6 mg/m ² /d i.v.
		mycin)	
		Daunorubicin	\Rightarrow 45-60 mg/m ² /d i.v.
		Doxorubicin	\Rightarrow 45-60 mg/m ² i.v.
		Epirubicin	\Rightarrow 60-80 mg/m ² i.v.
		Idarubicin	⇒ 10-12 mg/m² i.v. oder 35-50
	Einbau in RNS		mg/m² p.o.
		Mitoxantron	\Rightarrow 10-12 mg/m ² i.v.
		Mitomycin C	,
		Antimetaboliten (s.o.)	⇒ 10-20 mg/m² i.v.
Pro-	Modifikationen der	Hormone & Antagonisten	
tein	Rezeptorbindungen	Vitamin-A-Säure-Deriv.	
reni.	1/erebiologiganidett	Tretinoin	\Rightarrow 45 mg/m ²
	Inhibition do-	Vincaalkaloide	
	Inhibition der	VIIICAAINAIUIUE	·
	Tubulin-Poly-		- 1520 mg iv
	<u>merisation</u>	Vincristin	⇒ 1,5-2,0 mg i.v.
			\Rightarrow 2-3 mg/m ² i.v.

······································	Vindesin Vinblastin Vinorelbin	\Rightarrow 4-8 mg/m ² i.v. \Rightarrow 25-30 mg/m ²
	Taxane Taxol (Paclitaxel) Taxotere (Docetaxel)	⇒ 175 mg/m ² i.v. ⇒ 100 mg/m ² i.v.
 Proteinvernetzung Phosphorylierung	Alkylanzien (s. o.) Proteinkinase-C-Inhibi- toren Miltefosin	⇒ max. 5 ml/d, lokale Anwen- dung

HD = Hochdosis-Therapie

Ein bevorzugtes Nukleinsäuresynthese-hemmendes Zytostatikum ist Gemcitabin. Ein weiteres ebenfalls bevorzugtes Nukleinsäuresynthese-hemmendes Zytostatikum ist die Verbindung Mitomycin C. Im folgenden sind die Strukturformeln dieser beiden Verbindungen dargestellt:

Mitomycin C gehört zur Gruppe der alkylierenden Mittel. Nach Reduktion der Chinon-Einheit wird Methanol freigesetzt, was die Öffnung des Aziridinringes zur Bildung eines alkylierenden Metaboliten erleichtert. Ein weiteres alkylierendes Molekül wird durch chemische oder enzymatische Abtrennung der Carbamatseitenketten gebildet. Darüber hinaus ist die Reduktion der Chinon-Einheit an die Bildung reaktiver Sauerstoffmoleküle gebunden, welche ebenfalls einen alkylierenden Effekt haben. Die antitumorale Wirkung von Mitomycin ist hauptsächlich auf die Alkylierung von DNA zurückzuführen.

Gemcitabin ist ein Pyrimidinantimetabolit. Nach Aufnahme in die Zelle wird es zu

2',2'-Difluordeoxycytidintriphosphat metabolisiert. Die Inkorporation von Gemcitabin in-die DNA unterbricht die DNA-Strang-Synthese, so daß folglich keine Zellteilung mehr möglich ist.

Gemcitabin und Mitomycin C haben unterschiedliche Wirkweisen, doch interagieren beide Verbindungen direkt mit zellulärer DNA und führen zu Fehlern bzw. dem Abbruch der DNA-Replikation.

Um eine Wirkungssteigerung eines Zytostatikums oder der Kombination mehrerer Zytostatika zu erzielen, wird Selen und/oder mindestens eine Selenverbindung in einer Konzentration von 0,1 mg/kg Körpergewicht bis 1,25 mg/kg Körpergewicht, und das Zytostatikum in einer Konzentration von 2 mg/m² Körperoberfläche bis 240 g/m² Körperoberfläche verwendet. Dabei liegt die bevorzugte Konzentration von Selen bzw. einer Selenverbindung in einem Bereich von 0,1 mg/kg Körpergewicht bis 0,3 mg/kg Körpergewicht, und die des Zytostatikums in einem Bereich von 20 mg/m² Körperoberfläche bis 1000 mg/m² Körperoberfläche.

Der Einsatz der genannten Kombination in der zytostatischen Therapie ist besonders bevorzugt.

Des weiteren stellt die Erfindung einen Kit zur Verfügung, welcher Selen und/oder mindestens eine Selenverbindung und ein Zytostatikum oder eine Mischung von Zytostatika als Kombinationspräparat zur gleichzeitigen, getrennten oder zeitlich abgestuften Anwendung in der zytostatischen Therapie umfaßt. Dabei ist bevorzugt, daß die im Kit enthaltene Selenverbindung eine organische Selenverbindung ist. Besonders bevorzugte organische Selenverbindungen sind die Selenaminosäuren Selenomethionin und Selenocystein sowie die Verbindung Phenylenbis(methylen)selencyanat. Darüber hinaus wird in einer weiteren Ausführungsform als Selenverbindung ein Selenoxid bevorzugt. Besonders bevorzugt ist dabei ein Salz von SeO₂, z.B. Na₂SeO₃.

Weiterhin kann der oben erwähnte Kit ein Zytostatikum enthalten, welches ein Mitosehemmendes Zytostatikum, z.B. ausgewählt aus den oben erwähnten Verbindungen, ist. Des weiteren kann das Zytostatikum ebenfalls ein Nukleinsäuresynthese-hemmendes

Zytostatikum sein. Dabei sind die Verbindungen Gemcitabin und Mitomycin C besonders bevorzugte Nukleinsäuresynthese-hemmende Zytostatika.

Der erfindungsgemäße Kit enthält Selen und/oder mindestens eine Selenverbindung in einer Konzentration von 0,1 mg/kg Körpergewicht bis 1,25 mg/kg Körpergewicht und ein wie oben beschriebenes Zytostatikum in einer Konzentration von 2 mg/m² Körperoberfläche bis 240 g/m² Körperoberfläche. Dabei ist ein Konzentrationsbereich von 0,1 mg/kg Körpergewicht bis 0,3 mg/kg Körpergewicht für Selen bzw. eine Selenverbindung und ein Konzentrationsbereich von 20 mg/kg Körpergewicht bis 1000 mg/m² Körperoberfläche eines wie oben charakterisierten Zytostatikums bevorzugt.

Die Kombinationen aus Selenverbindung und Zytostatikum bzw. mehreren Zytostatika können in fester oder flüssiger Form verabreicht werden. Dabei kann die Applikation oral, rectal, nasal, topical (einschließlich buccal und sublingual), vaginal oder parenteral (einschließlich intramuskulär, subcutan und intravenös) oder durch Inhalation erfolgen. Sie können dabei zusammen mit herkömmlichen Adjuvantien, Trägerstoffen und/oder Verdünnungsmitteln angeboten werden.

Die festen Darreichungsformen umfassen Tabletten, Kapseln, Pulver, Pillen, Pastillen, Suppositorien und gekörnte Darreichungsformen. Sie können ebenfalls Zusatzstoffe, wie Geschmacksstoffe, Farbstoffe, Verdünnungsmittel, Weichmacher, Bindemittel, Konservierungsmittel, Sprengmittel und/oder umschließende Materialien miteinschließen.

Flüssige Darreichungsformen umfassen Lösungen, Suspensionen und Emulsionen. Diese könne ebenfalls zusammen mit den obengenannten Zusatzstoffen angeboten werden.

Die folgenden Figuren und Beispiele erläutern die vorliegende Erfindung.

Fig. 1: Effekt von Natriumselenit (3 μM und 30 μM) auf die Koloniebildung von pankreatischen Tumorxenotransplantaten (PAXF 546 und 736) in dem klonogenen <u>in vittro-</u>Test in verschiedenen Experimenten. T/C = Anzahl an Tumorkelonien in Selen-behandelten Proben geteilt durch die Anzahl an Kolonien in den unbehandelten Proben in %.

WO 99/64018

- Fig. 2: Effekt von Selen oder Mitomycin C alleine oder zusammen auf das <u>in vitro-</u>
 Wachstum des pankreatischen Tumorxenotransplantates PAXF 546 (klonogener
 Test, kontinuierliche Wirkstoffexposition) A C: Dosis/Wirkungs-Kurven von Mitomycin C und Mytomycin C in Kombination mit 3 μM Selen (A) oder 30 μM Selen
 (B, C). Der Effekt von Selen alleine ist durch gestrichelte Linien angedeutet.
- Fig. 3: Vergleich der experimentell beobachteten und erwarteten T/C-Werte von Selen/Mitomycin C-Kombinationen. Erwartete T/C-Werte für einen additiven Wirkstoffeffekt sind als offene Balken dargestellt, experimentell beobachtete T/C-Werte als ausgefüllte Balken; * bezeichnete einen signifikanten Unterschied (p < 0,01) zwischen T/C_{erwartet} und T/C_{beobachtet} und daher einen Wirkstoffsynergismus. A-C: Kombination von Mitomycin C mit 3 μM Selen (A) oder 30 μM Selen (B, C).
- Fig. 4: Effekt von Selen und Gemcitabin alleine oder in Kombination auf das <u>in vitro-</u>
 Wachstum des pankreatischen Tumorxenotransplantates PAXF 546 (klonogener
 Test, kontinuierliche Wirkstoffexposition). A-C: Dosis/ Wirkungs-Kurve von
 Gemcitabin alleine und Gemcitabin in Kombination mit 3 μM Selen (A) oder 30
 μM Selen (B, C). Der Effekt von Selen alleine wird durch gestrichelte Linien angedeutet.
- Fig. 5: Vergleich der experimentell beobachteten und erwarteten T/C-Werte von Selen/Gemcitabin-Kombinationen. Erwartete T/C-Werte für den additiven Wirkstoffeffekt sind als offene Balken dargestellt, experimentell beobachtete T/C-Werte als ausgefüllte Ballken; * weist auf einen signifikanten Unterschied (p < 0,01) zwischen T/C_{erwartet} und T/C_{beobachtet} und daher Wirkstoffsynergismus hin. A/C: Kombination von Gemcitabin mit 3 μM Selen (A) oder 30 μM Selen (B, C).

Beispiele:

1. Material und Methoden

Natriumselenit (Selenase®) wurde von der G. N. Pharm GmbH, Fellbach, Deutschland zur Verfügung gestellt. Die 0,9 %-ige NaCl-Lösung enthielt 50 μg/ml (0,63 mM) an Selen

als Na₂SeO₃ x 5H₂O. Gemcitabin und Mitomycin C wurden von einer Apotheke bezogen und als klinische Formulierungen benutzt.

1.1 Koloniebildungstest

Herstellung einer Einzelzellsuspension von menschlichen Xenotransplantaten

Solide menschliche Tumorxenotransplantate, die subkutan in seriellen Passagen in Thymus-aplastischen Nacktmäusen (NMRI nu/nu-Stamm; aus eigener Zucht) wuchsen, wurden unter sterilen Bedingungen entfernt, die Zellen mechanisch vereinzelt und anschließend mit einem Enzymgemisch, bestehend aus Kollagenase (1,2-1,8 E/ml, Worthington), DNAse (375 E/ml, Boehringer Mannheim) und Hyaluronidase (29 E/ml, Boehringer Mannheim) in RPMI 1640 bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Die Zellmischung wurde durch Siebe mit 200 µm und 50 µm Porengröße passiert und danach zweimal mit PBS gewaschen. Der Prozentsatz an lebenden Zellen wurde in einer Neubauer-Zellkammer unter Verwendung von Trypanblau-Ausschluß bestimmt.

1.2 Kultivierungsverfahren

Der klonogene Test wurde gemäß dem von Hamburger und Salmon beschriebenen modifizierten 2-Lagen Soft-Agar-Test durchgeführt (Hamburger und Salmon, Science, 197: 461-463, 1977). Die untere Schicht bestand aus 0,2 ml Iscoves's Modified Dulbecco's Medium mit 20% fötalem Kälberserum und 0,75% Agar. 8 x 10³ bis 1,6 x 10⁴ Zellen wurden zu 0,2 ml desselben Mediums zusammen mit 0,4% Agar zugesetzt und in bereits beschichtete 24-multiwell-Platten gegeben. Teststubstanzen wurden durch fortgesetzte Exposition (drug overlay) in 0,2 ml Medium zugesetzt. Jede Schale schloß 6 Kontrollvertiefungen ein, welche die mit Trägersubstanz und Testsubstanz behandelten Gruppen in 6 Konzentrationen in 3-facher Ausführung enthielten.

Die Kulturen wurden bei 37° und 7% CO₂ in einer humidifizierten Atmosphäre für 5 bis 15 Tage, abhängig von der Verdopplungszeit der Tumorstammzellen, inkubiert und das Koloniewachstum wurde unter einem Inversmikroskop beobachtet. In dieser Zeitspanne führte das in vitro-Tumorwachstum zu der Bildung von Kolonien mit einem Durchmesser von ≥ 50 µm. Wenn maximale Koloniebildung erreicht war, wurden Zählungen mit einem

automatischen Bildanalysesystem (OMNICOM Fas IV, Biosys GmbH) durchgeführt. 24 Stunden vor diesem Test wurden lebende Kolonien mit einer sterilen wäßrigen Lösung an 2-(4-lodphenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazoliumchlorid (1 mg/ml, 100 µl/Vertiefung) angefärbt. Der Effekt der Testsubstanzen wurde dargestellt als Prozent der überlebenden Zellen, erhalten durch Vergleich der durchschnittlichen Koloniezahlen der behandelten Platten mit der durchschnittlichen Koloniezahl der unbehandelten Kontrolle (Test-versus-Kontroll-Gruppenwert, T/C = Koloniezahl_{behandelte} Gruppe*

Ein Test wurde als aussagekräftig erachtet, wenn die folgenden Kontrollkriterien erfüllt waren:

- durchschnitliche Koloniezahl der Kontrollgruppenplatten für 24-multiwells
 ≥20 Kolonien mit einem Koloniedurchmesser von ≥ 50 µm.
- Kolonieüberlebenszahl in Vertiefungen, die mit der Positivreferenzverbindung 5-Fluoruracil (bei einer toxischen Dosis von 1000 μg/ml) behandelt wurden
 30% der Kontrollen.
- Koeffizient der Variation in der Kontrollgruppe ≤ 50%. IC₅₀ und IC₇₀-Werte wurden durch Auftragen der Verbindungskonzentration gegen Zellüberlebensrate bestimmt. Durchschnittliche IC₅₀ und IC₇₀-Werte wurden gemäß der folgenden Formel berechnet:

Durchschnittlicher IC₅₀ und IC₇₀ =
$$\frac{\sum_{x=1}^{n} \log (IC_{50,70})_x}{n}$$

mit x = spezifischem Tumorxenotransplantat und n = Gesamtzahl an untersuchten Tumorxenotransplantaten. Falls kein IC_{50} oder IC_{70} -Wert mit dem untersuchten Dosisbereich bestimmt werden konnte, wurde die höchste bzw. niedrigste untersüchte Konzentration für die Berechnung herangezogen.

1.3 Kombinationsstudien

Die Inhibition der Koloniebildung durch die Chemotherapeutika Gemcitabin und Mitomycin C alleine oder in Kombination mit Selen wurden in pankreatischen menschlichen Tumorxenotransplantaten PAXF 546 und 736, unter Verwendung des oben beschriebenen klonogenen Tests untersucht. Jedes Experiment umfaßt 6 Konzentrationen an Chemotherapeutika, 2 Konzentrationen an Selen (3 und 30 μΜ) und die Kombination aller Dosen mit Selen bei 3 und 30 μΜ. Alle Verbindungen und Kombinationen wurden dreifach untersucht. Konzentrationen der Chemotherapeutika wurden so gewählt, daß T/C-Werte von 0 bis 100% daraus resultierten. Jedes Experiment wurde zweimal durchgeführt. Die Wirkung einer Kombination von Verbindungen wurde durch Vergleich des experimentellen beobachteten T/C-Wertes einer Selen/Zytostatikum-Kombination (T/C_{beobachtet}(A+B)) mit dem erwarteten T/C-Wert für diese Kombination (T/C_{orwartet}(A+B)) bestimmt, berechnet durch Multiplizieren der Anzahl überlebender Kolonien, erhalten nach Behandlung der Zellen mit den jeweiligen Einzelsubstanzen (T/C (A) und T/C (B)) unter Verwendung der folgenden Gleichung (Multiplikationsverfahren z.B. beschrieben von Berenbaum, 1989, Pharmacol. Rev., 41:93-141):

$$T/C_{erwartet}(A+B) = T/C (A) \times T/C (B)/100$$

Für eine Null-interaktive Wirkstoffkombination (additive Wirkstoffeffekte) ist $T/C_{enwartet}$ (A+B) = $T/C_{beobachtet}$ (A+B). Eine Wirkstoffkombination ist synergistisch, wenn $T/C_{beobachtet}$ (A+B) statistisch signifikant > $T/C_{enwartet}$ (A+B) ist. Statistische Signifikanz wurde durch den T-Test bestimmt.

2. Ergebnisse

2.1. <u>In vitro</u>-Antitumoraktivität von Natriumselenit auf menschliche Tumorxenotransplantate

Die zytotoxische Aktivität von Natriumselenit wurde unter Verwendung des klonogenen Tests an den folgenden menschlichen Tumorxenotransplantaten untersucht:

Tabelle 1
Untersuchte menschliche Tumorxenotransplantate

Tumor		ursprüngliche Histologie
Lunge	LXFL 529	nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom
	LXFS 650	kleinzelliges Bronchialkarzinom
Brust	MAXF 401NL	Adenokarzinom, Östrogenrezeptor negativ, Progesteronrezeptor negativ
	MAXF MCF7X	Adenokarzinom, Östrogenrezeptor negativ, Progesteronrezeptor negativ
Eierstock	OVXF 899	Adenokarzinom
	OVXF 1353	adenoides Karzinom
Pankreas	PAXF 546	adenosquamöses Karzinom
	PAXF 736	Adenokarzinom
Prostata	PC3MX	Adenokarzinom
	DU145X	Karzinom
Niere	RXF 393	Hypernephrom
	RXF 944LX	Hypernephrom

Es wurden Natriumselenitkonzentrationen zwischen 0,001 und 100 μ M eingesetzt. T/C-Werte, die in den verschiedenen Tumorxenotransplantaten erhalten wurden, sind in Tabelle 2 gezeigt. IC₅₀ und IC₇₀-Werte sowie ein IC₇₀-Balkendiagramm, welches die Sensitivität der verschiedenen Tumore gegenüber Selenbehandlung zeigt, sind in Tabelle 3 angegeben.

Die Inhibition der Koloniebildung hängt von der Selendosis ab. Bis zu 1 μM konnte kein deutlicher zytotoxischer Effekt beobachtet werden. Bei 10 μM Selen wurden T/C-Werte zwischen 30% in 2 von 12 Xenotransplantaten (LXFL 529, PRXF DU145X) erhalten. Bei sehr hohen Selenkonzentrationen von 100 μM wurden T/C-Werte unter 20% in allen Xenotransplantaten erreicht, was auf einen unspezifisch zytotoxischen Effekt hinweist.

Tabelle 2 In vitro-Effekt von Natriumselenit auf menschliche Tumorxenotransplantate

TUMOR/	EXP.	Tes	t/Kontrolle	(%) bei	Wirkstoffk	onzentratio	n [µM]
PASSAGE	Nr.	,					
Nr.		.001	.01		1	10.	100.
LXFL 529/18	X182AM	90 -	78 -	72 -	61 -	9 +++	0 +++
LXFS 650/9	X199AM	100 -	100 -	98 -	84 -	109 -	16 ++
MAXF 401/16 MCF7X/28	X186AM X218AM	67 s- 93 -	81 s- 85 -	53 - 90 -	74 - 78 -	66 - 97 -	8 +++ 0 +++
OVXF 899/33 1353/17	X185AM X217AM	80 - 96 -	79 - 91 -	66 - 100 -	70 - 90 -	73 - 100 -	1 +++ 0 +++
PAXF 546/2 736/17	*(2) X184AM	82 - 87 -	112 - 77 -	100 - 94 -	104 - 88 -	88 - 90 -	2 +++ 4 +++
PRXF PC3M/3 DU145X/15	X189/AM X229AM	91 - 97 -	91 - 96 -	89 - 92 -	85 - 91 -	38 + 5 +++	1 +++ 0 +++
RXF 393/9 423/16	X194AM X183AM	62 - 99 -	45 - 111 -	31 + 120 -	31 + 92 -	32 + 110 -	10 +++
aktiv(++, +++ nur Xenotrar		0/12 0%	0/12 0%	0/12 0%	0/12 0%	2/12 17%	12/12 100%

Tabellenlegende:

LXF Lungen A Adeno, L großzelliges, S kleinzelliges Krebsxenotransplantat; MAXF Brustkrebsxenotransplantat; OVXF Eierstockkrebsxenotransplantat, PAXF Pankreas, PRXF Prostatakrebsxenotransplantat; RXF Nierenkrebsxenotransplantat

In dem IC₇₀-Balkendiagramm (IC₇₀-Darstellung, Tabelle 3) sind Abweichungen von einzelnen IC70-Werten von dem Durchschnittswert als Balken in logarithmischer Darstel-

^{- (}T/C \geq 50%); + (30% \leq T/C < 50%); ++ (10% < T/C < 30%); +++ (T/C \leq 10%),

s Ergebnis einer Platte

lung präsentiert. Balken nach links zeigen IC₇₀-Werte, die geringer als der Durchschnittswert sind, Balken nach rechts zeigen Werte, die höher als der Durchschnittswert sind. Die IC₇₀-Darstellung zeigt daher ein charkateristisches anti-proliferatives Profil der Verbindung.

Der durchschnittliche IC₅₀-Wert von Natriumselenit war 15,5 μ M, der durchschnittliche IC₇₀-Wert 27 μ M. Das entspricht einer Selenkonzentration von 1,2 μ g/ml (durchschnittlicher IC₅₀-Wert) und 2,1 μ g/ml (durchschnittlicher IC₇₀ -Wert). Verglichen mit der Wirksamkeit von Standardchemotherapeutika in diesem Test liegen die Werte im Rahmen der IC₅₀ und IC₇₀-Werte der alkylierenden Mittel Ifosfamid und Cyclophosphamid. Die meisten anderen Standard-alkylierenden Mittel haben durchschnittliche IC₇₀-Werte von < 0,1 μ g/ml.

Die sensitivsten Tumorxenotransplantate, repräsentiert durch IC₇₀-Werte und Balken nach links in Tabelle 3, waren das große Lungenzellkrebsxenotransplantat LXFL 529, das Nierenkrebsxenotransplantat RXF 393 und die Prostataxenotransplantate PC3M und DU145X.

Tabelle 3
In vitro-Effekt von Natriumselenit auf menschliche Tumorxenotransplantate

TUMOR/ PASSAGE	Kolonie	-	Verteilung von IC lo	C ₇₀ , bezogen auf den g. Achseneinteilung	Durchschnittswert		I C ₅₀	I C ₇₀
Nr.	Kontr.	*0.01	*0.1	Durch-	* 10	*100	μМ	μМ
				schnitt				
				26.967				
LXFL		•	•	<u>1</u>	•	•		
529/18	129	•			•	•	.627	3.945
		•	•		•	•		
LXFS		•	•	<u> </u>	•	•		
550/9	107		•	-	•	. 43	3.093	70.706
		•	•		•	•		
MAXF			•		•	•		
401/16	37	•			•		3.873	41.753
MCF7X/2	3 200	-	•	<u> </u>		. 30	1.516	49.059
			•	1	•	•		
DVXF					•	•		
899/33	50						.866	39.556
1353/17	120				•	. 31	.622	50.118
		_		ı	•	•		
PAXF		-	•		•	•		
546/2	80						7.660	47.251
736/17	55	-				. 29	7.182	49.851
30,		-		1				
PRXF		-				•		
PC3M/3	140	-			•		5.554	16.451
DU145X/		-			•		2.997	5.120
		-		1	•	•		
RXF		-		ĺ	•	•		
393/9	23	-		فسسب	•		n.e.	12.328
423/16	97	•				. 39	5.111	53.366
, .0	• •	•	•	1		•		
Durch- schnitt		n=12		26.967			15.5	27.0

2.2 In vitro Kombinationsstudien

Um zu untersuchen, ob Selen in der Form von Natriumselenit den anti-proliferativen Effekt von Standardchemotherapeutika potenzieren kann, wurden zwei pankreatische menschliche Tumorxenotransplantate (PAXF 546 und PAXF 736) Gemcitabin, Mitomycin C oder Natriumselenit alleine oder Natriumselenit in Kombination mit einem der beiden Chemotherapeutika ausgesetzt.

Festgelegte Konzentrationen an Natriumselenit (3 oder 30 µM) wurden den Zellen zusammen mit 6 verschiedenen Konzentrationen der Chemotherapeutika zugesetzt. Gemäß den in Tabelle 2 gezeigten Daten wurde erwartet, daß eine Natriumselenitkonzentration von 3 µM die Koloniebildung zweier pankreatischer Tumorzellinien nur marginal beeinflußt. Dies wurde durch die Ergebnisse bestätigt, wenn Natriumselenit alleine bei dieser Konzentration in den Kombinationsstudien eingesetzt wurde (Figur 1). Die höhere Natriumselenitkonzentration von 30 µM sollte einen stärkeren Einfluß auf die Tumorko-

loniebildung haben, da die Tumorkoloniebildungsrate beider pankreatischer Tumoren schnell abfällt, wenn die Natriumselenitkonzentration von 10 auf 100 µM steigt (Tabelle 2). Dies wird in weiteren Experimenten in Figur 1 gezeigt. Die Abweichung der T/C-Werte bei 30 µM in den beiden Experimenten (Figur 1) wird durch die sehr steilen Dosis/Effekt-Werte von Natriumselenit bei Konzentrationen um 30 µM verursacht. Daher wurden Kombinationsexperimente mit PAXF 546 bei dieser Selenkonzentration getrennt bewertet. Im Falle von PAXF 736 konnte lediglich Experiment X265 für die Bewertung herangezogen werden, da in Experiment X290 30 µM an Selen bereits einen stark zytotoxischen Effekt mit einem T/C-Wert von 5% zeigten.

Die folgenden Tabellen 4a bis 4d zeigen die Ergebnisse der Inkubation zweier pankreatischer Xenotransplantate mit verschiedenen Konzentrationen an Selen und den Zytostatika Mitomycin C und Gemcitabin. Um zu bestimmen, ob eine Wirkstoffkombination einen additiven Effekt der Einzelwirkstoffe aufweist, wurden die experimentell ermittelten T/C-Werte für eine spezifische Kombination mit den Werten, die für einen additiven Effekt erwartet wurden, verglichen (siehe Material und Methoden). Wenn das pankreatische Tumorxenotransplantat PAXF 736 gleichzeitig mit Natriumselenit und Mitomycin C oder Gemcitabin behandelt wurde, konnte weder bei einer Konzentration von 3 µM noch bei einer Konzentration von 30 µM Natriumselenit ein synergistischer Effekt festgestellt werden. Es wurde ebenfalls kein synergistischer Effekt von 3 µM Natriumselenit und allen der getesteten Konzentrationen an Chemotherapeutika in dem Xenotransplantat PAXF 546 beobachtet oder wenn geringe Konzentrationen der Chemotherapeutika mit 30 µM an Natriumselenit kombiniert wurden. Wurden jedoch höhere Dosierungen der Chemotherapeutika, bei denen zytotoxische Effekte beobachtet werden konnten, zusammen mit 30 µM Natriumselenit eingesetzt, wurde ein Synergismus in Kombination mit Mitomycin C und Gemcitabin beobachtet (Tabelle 4a, 4b).

Tabelle 4a

Inhibition von Koloniewachstum des Pankreaskrebs-Xenotransplantates PAXF 546 durch Na2SeO3 oder Mitomycin C alleine oder in Kombination in vitro

		Natriur	Natriumselenit		T/C in	% bei einer M	itomycin C Kc	T/C in % bei einer Mitomycin C Konzentration (µM) von	M) von		
Behandlung		, Konz. T/C in in µM %	T/C in %	1x10 ⁻⁶	1×10.5	1×104	1x10 ⁻³	1x10 ⁻²	1x10 ⁻¹	1.0	Synergismus
Mitomycin C (X261, X295)	(X261, X295)			87 ± 11	84 ± 14	70 ± 10	70 ± 13	80 ± 12	57 ± 8	5±2	
ပ	erwärt. beob. † 3.0 (X261, X295)	3.0	91 ± 8	84 ± 15	84 ± 13	72 ± 12	66 ± 10	60 ± 8	60 ± 10	4±2	iga
+ 3 µM Se	erwartet**			76±12	76 ± 15	64 ± 11	64 ± 14	73 ± 13	52 ± 9	5±3	
	erwart. beob. (X261)	30.0	80 ± 13	69 ± 10	58 ± 8	49±7	50 ± 8	35 ± 6***	3±2		partiell
Mitomycin C	erwartet .			70 ± 14	67 ± 16	56 ± 14	56 ± 15	64±14	46±10		
+ 30 µM Se	erwart. beob. (X295)	30.0	49 ± 6	38 ± 8	37 ±6	31 ± 5	30 ± 6	26±5	14±3		Dartiell
	erwartet			43 ± 12	41 ± 15	34 ± 11	34 ± 14	39 ± 12	28±9	· · ·	

experimentell beobachtete T/C-Werte für die Kombination von Mitomycin C und Selen

erwartete T/C-Werte für die Kombination, errechnet durch das Verfahren: T/Cerwartet = T/Cse x T/Cwirkstoff/100; T/C: T/C-Wert in % bei einer gegebenen Behandlung bei einer spezifischen Konzentration

synergistische Wirkstoffkonzentrationen sind durch Kursivdruck gekennzeichnet **

Tabelle 4b

Inhibition von Koloniewachstum des Pankreaskrebs-Xenotransplantates PAXF 546 durch Na₂SeO₃ oder Gemcitabin alleine oder in , Kombination in vitro

=		Natrium	Natriumselenit		T/C in	% bei einer G	T/C in % bei einer Gemcitabin Konzentration (µM) von	zentration (µN	nov (h		
benandlung	·	Konz. in pM	Konz. T/C in in µM %	1×10 ⁻⁶	1×10 ⁻⁵	1×10⁴	1×10 ⁻³	1×10 ⁻²	1×10-1	1.0	Synergismus
Gemcitabin ·	(X261, X295)			85 ± 15	73 ± 20	80 ± 12	83 ± 12	61 ± 11	48 ± 8	30 ± 6	
Gemcitabin	erwart. beob. * (X261, X295)	3.0	91±8	86 ± 16	93 ± 16	70 ± 18	72 ± 11	50 ± 9	41 ± 10	30 ± 10	nein
+ 3 pin se	erwartet**			77 ± 17	66 ± 23	73 ± 14	76 ± 14	56 ± 12	44 ± 10	34 ± 8	
	erwart. beob. (X261)	30.0	80 ± 13	74 ± 12	57 ± 75	58±7	40 ± 8***	24 ± 7	27 ± 4		it
Gemcitabin	erwartet			68 ± 17.	58 ± 23	64 ± 15	66 ± 15	49±14	38 ± 12		
+ 30 µМ Se	erwart. beob. (X295)	30.0	49 ± 6	55 ±12	41 ± 10	50 ± 9	23 ± 7	23±6	11±6	10±3	Dartiell
	erwartet			43±14	36 ± 21	39 ± 13	41 ± 13	30 ± 12	24±9	18 ± 7	

erwartete T/C-Werte für die Kombination, errechnet durch das Verfahren: T/Cervartet = T/Cse x T/Cwritstorf/100; T/C: T/C-Wert in % experimentell beobachtete T/C-Werte für die Kombination von Gemcitabin und Selen

synergistische Wirkstoffkonzentrationen sind durch Kursivdruck gekennzeichnet bei einer gegebenen Behandlung bei einer spezifischen Konzentration **

Tabelle 4c

Inhibition von Koloniewachstum des Pankreaskrebs-Xenotransplantates PAXF 736 durch Na₂SeO₃ oder Mitomycin C alleine oder in , Kombination in vitro

		Natrium	Iriumselenit		T/C in % be	einer Mitom	T/C in % bei einer Mitomycin C Konzentration von	ntration von'		
Behandlung		Konz. in µM	T/C in %	1x10- ⁶	1×10 ⁻⁵	1×10⁴	1×10 ⁻³	1×10.5	1×10.1	oynergismus
Mitomycin C	(X261, X295)			77 ± 13	58 ± 10	56 ± 11	46±8	30 ± 7	11±7	
ပ	erwart. beob.* (X265, X290)	3.0	81 ± 12	90 ± 15	60 ± 11	56 ± 8	48±7	29±3	10±3	nein
+ 3 µM Se	erwartet**			70 ± 16	53 ± 13	51 ± 13	42 ± 12	27 ± 9	10 ± 9	
	erwart. beob. (X265)	30.0	43 ± 8	25 ± 10	15 ± 7	27 ± 7	17 ± 6	19±6	4±3	Ueju
Mitomocin C	erwartet			33 ± 14	25 ± 11	24 ± 12	20 ± 9	14 ± 8	5±5	
+ 30 µM Se	erwart. beob. (X290)	30.0	5±2	4±2	3 ± 2	3±3	2±2	1 + 1	1 + 1	n.b.**
	erwartet 1									

erwartete T/C-Werte für die Kombination, errechnet durch das Multiplikationsverfahren: T/Commartet = T/Cs. x T/Committee T/C. experimentell beobachtete T/C-Werte für die Kombination von Mitomycin C und Selen T/C-Wert in % bei einer gegebenen Behandlung bei einer spezifischen Konzentration *

^{***} nicht bestirhimt

Tabelle 4d

Inhibition von Koloniewachstum des Pankreaskrebs-Xenotransplantates PAXF 736 durch Na₂SeO₃ oder Gemcitabin alleine oder in , Kombination in vitro

		Natriums	Natriumselenit l		T/C in % bei	siner Gemcita	bin Konzentra	T/C in % bel einer Gemcitabin Konzentration (µM) von		
Behandlung		Konz. 7 in µM	nz.) T/C in µM %	1x10 ⁻⁸	1x10 ⁻⁵	1×10⁴	1×10-3	1×10 ⁻²	1×10.1	Synergismus
Gemcitabin	(X261, X295)			89 ± 11	78 ± 14	84 ± 12	77 ± 13	71 ± 10	30 ± 8	
Gemcitabln	erwart. beob.* (X265, X290)	3.0	81 ± 12	79 ± 13	82 ± 12	84 ± 12	86 ± 15	66 ± 10	18 ± 8	nein
+ 3 µM Se	erwartet**			72 ± 12	63 ± 16	68 ± 13	62 ± 14	58 ± 12	24 ± 9	
	erwart. beob. (X265)	30.0	43 ± 8	64 ± 15	62 ± 20	59 ± 13	.39 ± 7	34 ± 6	14±5	nein
Gemcitabin	erwariet			38 ± 12	34 ± 15	36 ± 13	33 ± 14	31 ± 11	13±9	
+ 30 µМ Se	erwart. beob. (X290)	30.0	5±2	2 ∓ 6	5±3	4±3	5±3	3±2	1±1	n.b.**
	erwartet									

erwartete T/C-Werte für die Kombination, errechnet durch das Multiplikationsverfahren: T/Cerwartet = T/Cse x T/Cwirkstoff/100; T/C: experimentell beobachtete T/C-Werte für die Kombination von Gemcitabin und Selen T/C-Wert in % bei einer gegebenen Behandlung bei einer spezifischen Konzentration

*** nicht bestimmt

Tabelle 5a:
Sygergistische Effekte von Selen in Kombination mit Gemcitabin <u>in vitro</u>

Xenotrans-	Exp. Nr.	Se Konz.		Syne	ergismus	mit Gemo	itabin (µN	/];;	
plantat		[Mu]	1x10 ⁻⁵	1x10 ⁻⁵	1x10 ⁻¹	1x10 ⁻³	1x10 ⁻²	0.1	1.0
PAXF 546	X261, X295	3.0	-*	-	•	•	-	-	-
	X261	30.0	-	-	-	+*	+	+	п. ь.
	X295	30.0	•	-	-	+	+	+	+
PAXF 736	X265, X290	3.0	-	-	-	-	-	-	n. b.
	X265	30.0	-	-	-	-	-	-	п. ь.
	X290	30.0		nicht be	stimmt				

Tabelle 5b:Synergistische Effekte von Selen in Kombination mit Mitomycin C <u>in vitro</u>

Xenotrans- plantat	Exp. Nr.	Se Konz.	Synergismus mit Mitomycin C (μM)						
		[µM]	1x10⁻⁵		1x10 ⁻⁴	1x10 ⁻³	1x10 ⁻²	0.1	1.0
PAXF 546	X261, X295	3.0	-*	-	-	•	-	-	-
	X261	30.0	-	-	-	-	+*	+	n. b.
	X295	30.0	-	-	-	-	+	+	+
PAXF 736	X265, X290	3.0	-	-	-	-	-	-	n. b
	X265	30.0	-	-	-	•	-	-	n.: b.
	X290	30.0	nicht bestimmt						

^{*} Der experimentell bestimmte T/C-Wert für eine Wirkstoffkombination ist deutlich geringer (+) oder nicht geringer (-) als der erwartete T/C-Wert für diese Kombination: n.b.: nicht bestimmt.

In Figuren 2 und 3 ist der Effekt von Natriumselenit und Mitomycin C auf das <u>in vitro-</u>Wachstum von PAXF 546 dargestellt. Wenn 3 µM Natriumselenit zu verschiedenen Konzentrationen an Mitomycin C zugesetzt wurden, konnte keine Änderung in der Dosis/Wirkungskurve von Mitomycin C beobachtet werden, woraus folgert, daß bei dieser niedrigen Konzentration an Selenit kein Synergismus zwischen den beiden Wirkstoffen auftritt (Figuren 2a und 3a).

Wurden jedoch 30 µM Natriumselenit gleichzeitig mit Mitomycin C verabreicht, wurde ein synergistischer Effekt bei Mitomycin C-Konzentrationen > 0,01 µM beobachtet (Figuren 2b, c, 3b, c und Tabelle 5b).

Ähnliche Ergebnisse wurden mit der Kombination von Natriumselenit und Gemcitabin erzielt (Figur 4 und 5, Tabelle 5a). Eine synergistische Inhibition der Koloniebildung in PAXF 546 wurde ebenfalls bei einer Selenkonzentration von 30 µM und einer Gemcitabin-Konzentration höher als 0,1 nM festgestellt (Figur 5, Tabelle 5a).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, daß hohe Dosen an Selen das Wachstum vieler menschlicher Tumorxenotransplantate <u>in vitro</u> reduzieren. Gleichzeitige Behandlung der pankreatischen Krebszellen PAXF 546 mit 30 µM Selen und Zytostatika, welche direkt mit der zellulären DNA (z.B Gemcitabin und Mitomycin C) reagieren, resultiert in einer synergistischen Inhibierung des Tumorwachstums <u>in vitro</u>.

3. Fallstudien

Im folgenden sind die Falldokumentationen von fünf männlichen Tumorpatienten, die eine Kombinationstherapie von hochdosiertem Selen (10-30 mg) und verschiedenen Zytostatika erhielten, aufgeführt. Zwei der Patienten mit Pankreaskarzinom (Patient Nr. 4, 5) zeigten trotz weit fortgeschrittener Erkrankung ein gutes Ansprechen auf die Therapie, ebenso wie zwei Patienten (Patient Nr. 1, 3) mit hormonresistenten metastasierten Prostatakarzinomen. Ein Patient (Patient Nr. 2) mit metastasiertem Hypernephrom reagierte mit einer Teilremission auf die Therapie.

- 1.) Diagnose: hormonresistentes metastasiertes Prostatakarzinom
- 2.) Diagnose gestellt (Monat/Jahr): Juni 1994
- 3.) Histologie:cribriformes Prostatakarzinom, Grad III
- 4.) Tumorstadium zum Zeitpunkt des Therapiebeginns: T3, N2, M1

- (T = Ausdehnung des Primärtumors
- -N = Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen
 - M = Vorhandensein von Fernmetastasen)
- 5.) Lokalisation der Fernmetastasen: Lymphknoten, Knochen
- 6.) Tumorvorbehandlung: Hormontherapie von VI/94 bis XI/94
- 7.) Therapie mit Chemotherapie/Selen:
 - a) Chemotherapeutikum: 5-Fluoruracil, 750 mg, i.v., von XI/94 bis V/95 Mitomycin, 10 mg, i.v., von XI/94 bis V/95
 - b) Selen: Selenase®, 10 mg, i.v., von XI/94 bis V/95
 - c) Ansprechen der Therapie: Teilremission, vollständiger Rückgang der Lymph ödeme
 - d) Dauer des Ansprechens: 7 Monate
 - e) Grund für Beendigung der Therapie: Progression
 - f) Verträglichkeit der Therapie: gut
- 8.) Vor- und Begleiterkrankungen: koronale Herzkrankheit seit 1991, bei Therapiebeginn noch bestehend
- 9.) Begleittherapie während Chemo/Selen-Therapie: Kerlone, Adalat von 1991 bis V/95
- 10.) Überlebensstatus: tot

Todesdatum: 31.08.1994; tumorbedingt

- 1.) Diagnose: metastasiertes Hypernephrom
- 2.) Diagnose gestellt (Monat/Jahr): April 1996
- 3.) Histologie: Hypernephrom

- 4.) Tumorstadium zum Zeitpunkt des Therapiebeginns: T2, N1, M1
 - (T = Ausdehnung des Primärtumors
 - N = Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen
 - M = Vorhandensein von Fernmetastasen)
- 5.) Lokalisation der Fernmetastasen: Lunge, Leber
- 6.) Tumorvorbehandlung:

Nephrektomie 1996; Interleukin-II von IX/97 bis I/98

- 7.) Therapie mit Chemotherapie/Selen:
 - a) Chemotherapeutikum: Gemzar, 2 g, i.v., von I/98 bis V/98
 - b) Selen: Selenase®, 30 mg, i.v. von I/98 bis V/98
 - c) Ansprechen der Therapie: Teilremission
 - d) Dauer des Ansprechens: bislang 5 Monate
 - e) Grund für Beendigung der Therapie: keiner
 - f) Verträglichkeit der Therapie: gut
- 8.) Vor- und Begleiterkrankungen: Polyzythämie seit 1990; bei Therapiebeginn noch bestehend
- 9.) Begleittherapie während Chemo/Selen-Therapie: keine
- 10.) Überlebensstatus: lebend; zuletzt beobachtet 18.05.1998

- 1.) Diagnose: metastasiertes hormonresistentes Prostatakarzinom
- 2.) Diagnose gestellt (Monat/Jahr): Mai 1997
- 3.) Histologie: Adenokarzinom, Grad II

- 4.-)-Tumorstadium zum Zeitpunkt des Therapiebeginns: T3, N1, M1
 - (T = Ausdehnung des Primärtumors
 - N = Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen
 - M = Vorhandensein von Fernmetastasen)
- 5.) Lokalisation der Fernmetastasen: Knochen
- 6.) Tumorvorbehandlung:Orchiektomie beiderseits 1997
- 7.) Therapie mit Chemotherapie/Selen:
 - a) Chemotherapeutikum: Adriblastin, 40 mg, i.v., von II/98 bis V/98
 - b) Selen: Selenase®, 30 mg, i.v., von II/98 bis V/98
 - c) Ansprechen der Therapie: Vollremission
 - d) Dauer des Ansprechens: bislang 3 Monate
 - e) Grund für Beendigung der Therapie: keiner
 - f) Verträglichkeit der Therapie: gut
- 8.) Vor- und Begleiterkrankungen: keine
- 9.) Begleittherapie während Chemo/Selen-Therapie: Bisphosphonat (Bondronat) von II/98 bis V/98
- 10.) Überlebensstatus: lebend; zuletzt beobachtet 20.05.1998

- 1.) Diagnose: Pankreaskarzinom
- 2.) Diagnose gestellt (Monat/Jahr): Oktober 1994
- 3.) Histologie: Adenokarzinom, Grad II

- 4.) Tumorstadium zum Zeitpunkt des Therapiebeginns: T4, N1, M0
 - (T = Ausdehnung des Primärtumors
 - N = Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen
 - M = Vorhandensein von Fernmetastasen)
- 5.) Lokalisation der Fernmetastasen: keine
- 6.) Tumorvorbehandlung: explorative Laparotomie 1994, Gastroenterostomie
- 7.) Therapie mit Chemotherapie/Selen:
 - a) Chemotherapeutikum: 5-Fluoruracil, 750 mg, i.v., von X/94 bis VI/95, Mitomycin, 10 mg, i.v., von X/94 bis VI/95
 - b) Selen: Selenase® 10 mg, i.v., von X/94 bis VI/95
 - c) Ansprechen der Therapie: Vollremission, Schmerzfreiheit, Gewichtszunahme
 - d) Dauer des Ansprechens: 9 Monate
 - e) Grund für Beendigung der Therapie: VI/95 Hirnmetastase
 - f) Verträglichkeit der Therapie: gut
- 8.) Vor- und Begleiterkrankungen: keine
- 9.) Begleittherapie während Chemo/Selen-Therapie: keine
- 10.) Überlebensstatus: Todesdatum 29.08.1995; tumorbedingt

- 1.) Diagnose: Pankreaskarzinom und Magenkarzinom
- 2.) Diagnose gestellt (Monat/Jahr): November 1997
- 3.) Histologie: Adenokarzinom, Grad III
- 4.) Tumorstadium zum Zeitpunkt des Therapiebeginns: T4, N1, M1

- (T = Ausdehnung des Primärtumors
- -N = Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen
 - M = Vorhandensein von Fernmetastasen)
- 5.) Lokalisation der Fernmetastasen: Leber, Lymphknoten
- 6.) Tumorvorbehandlung:
 - a) Operation: Probelaparotomie, Gastroenterostomie 1997
 - b) Chemotherapie: Gemza von XI/97 bis I/98, Hochdosis-5-Fluoruracil und Leukovorine von I/98 bis III/98, Oxaliplatin von III/98 bis IV/98
- 7.) Therapie mit Chemotherapie/Selen:
 - a) Chemotherapeutikum: Gemzar, 1,2 mg, i.v., von IV/98 bis V/98
 Mitomycin, 10 mg, i.v. von IV/98 bis V/98
 - b) Selen: Selenase®, 30 mg, i.v., von IV/98 bis V/98
 - c) Ansprechen der Therapie: Teilremission, erhebliche Schmerzreduktion
 - d) Dauer des Ansprechens: 1 Monat
 - e) Grund für Beendigung der Therapie: Tod
 - f) Verträglichkeit der Therapie: ausgeprägte Stomatitis
- 8.) Vor- und Begleiterkrankungen: keine
- 9.) Begleittherapie während Chemo/Selen-Therapie: keine
- 10.) Überlebensstatus: tot

Todesdatum: 13.05.1998;

Todesursache: Panzytopenie

Patentansprüche

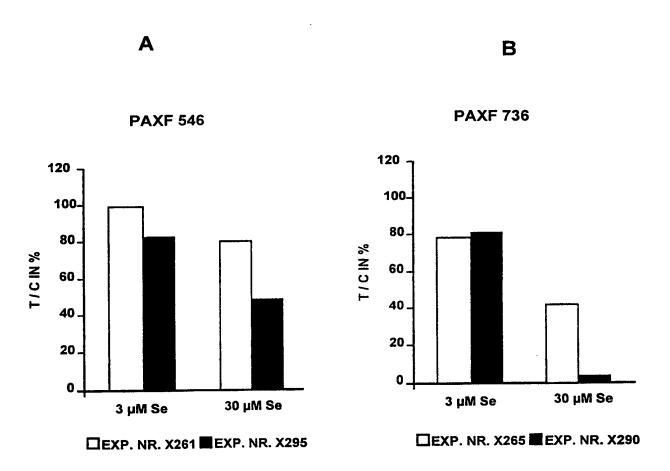
- 1. Verwendung von Selen und/oder mindestens einer Selenverbindung zur Wirkungssteigerung eines Zytostatikums oder einer Mischung von Zytostatika.
- 2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Selenverbindung eine organische Selenverbindung ist.
- 3. Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die organische Selenverbindung Selenomethionin ist.
- 4. Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die organische Selenverbindung Selenocystein ist.
- 5. Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die organische Selenverbindung Phenylenbis(methylen)selenocyanat ist.
- 6. Verwendung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Selenverbindung ein Selenoxid ist.
- 7. Verwendung nach Anspruch 1 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Selenverbindung ein Salz von SeO₂ ist.
- 8. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Zytostatikum ein Mitose-hemmendes Zytostatikum ist.
- 9. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Zytostatikum ein Nukleinsäuresynthese-hemmendes Zytostatikum ist.
- 10. Verwendung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Nukleinsäuresynthese-hemmende Zytostatikum Gemcitabin ist.

- 11. Verwendung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Nukleinsäuresynthese-hemmende Zytostatikum Mitomycin C ist.
- 12. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß Selen und/oder die Selenverbindung in einer Konzentration von 0,1 mg/kg Körpergewicht bis 1,25 mg/kg Körpergewicht, und das Zytostatikum in einer Konzentration von 2 mg/m² Körperoberfläche bis 240 g/m² Körperoberfläche verwendet wird.
- 13. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß Selen und/oder die Selenverbindung in einer Konzentration von 0,1 mg/kg Körpergewicht bis 0,3 mg/kg Körpergewicht, und das Zytostatikum in einer Konzentration von 20 mg/m² Körperoberfläche bis 1000 mg/m² Körperoberfläche verwendet wird.
- 14. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 13 in der zytostatischen Therapie.
- 15. Kit, umfassend Selen und/oder mindestens eine Selenverbindung und ein Zytostatikum oder eine Mischung von Zytostatika als Kombinationspräparat zur gleichzeitigen, getrennten oder zeitlich abgestuften Anwendung in der zytostatischen Therapie.
- 16. Kit nach Anspruch 15, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Selenverbindung eine organische Selenverbindung ist.
- 17. Kit nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die organische Selenverbindung Selenomethionin ist.
- 18. Kit nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die organische Selenverbindung Selenocystein ist.

- 19. Kit nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die organische Selenverbindung Phenylenbis(methylen)selenocyanat ist.
- 20. Kit nach Anspruch 15, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Selenverbindung ein Selenoxid ist.
- 21. Kit nach Anspruch 15 oder 20, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Selenverbindung ein Salz von SeO₂ ist.
- 22. Kit nach mindestens einem der Ansprüche 15 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß das Zytostatikum ein Mitose-hemmendes Zytostatikum ist.
- 23. Kit nach mindestens einem der Ansprüche 15 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß das Zytostatikum ein Nukleinsäuresynthese-hemmendes Zytostatikum ist.
- 24. Kit nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß das Nukleinsäuresynthesehemmende Zytostatikum Gemcitabin ist.
- 25. Kit nach Anspruch 23, **dadurch gekennzeichne**t, daß das Nukleinsäuresynthesehemmende Zytostatikum Mitomycin C ist.
- 26. Kit nach mindestens einem der Ansprüche 15 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß Selen und/oder die Selenverbindung in einer Konzentration von 0,1 mg/kg Körpergewicht bis 1,25 mg/kg Körpergewicht, und das Zytostatikum in einer Konzentration von 2 mg/m² Körperoberfläche bis 240 g/m² Körperoberfläche verwendet wird.
- 27. Kit nach mindestens einem der Ansprüche 15 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß Selen und/oder die Selenverbindung in einer Konzentration von 0,1 mg/kg Körpergewicht bis 0,3 mg/kg Körpergewicht, und das Zytostatikum in einer Konzentration von 20 mg/m² Körperoberfläche bis 1000 mg/m² Körperoberfläche verwendet wird.

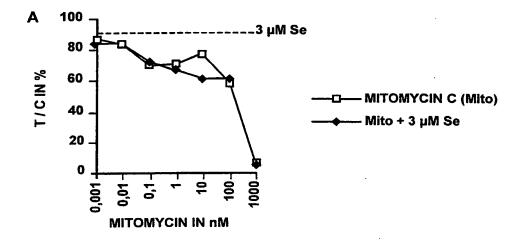
1/5

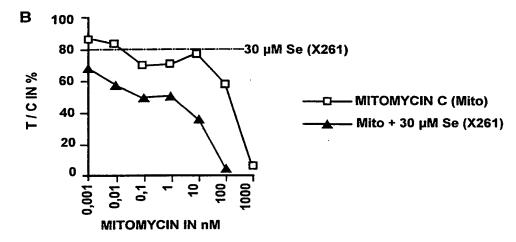
Fig. 1

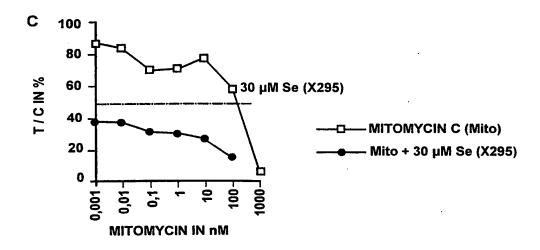


2/5

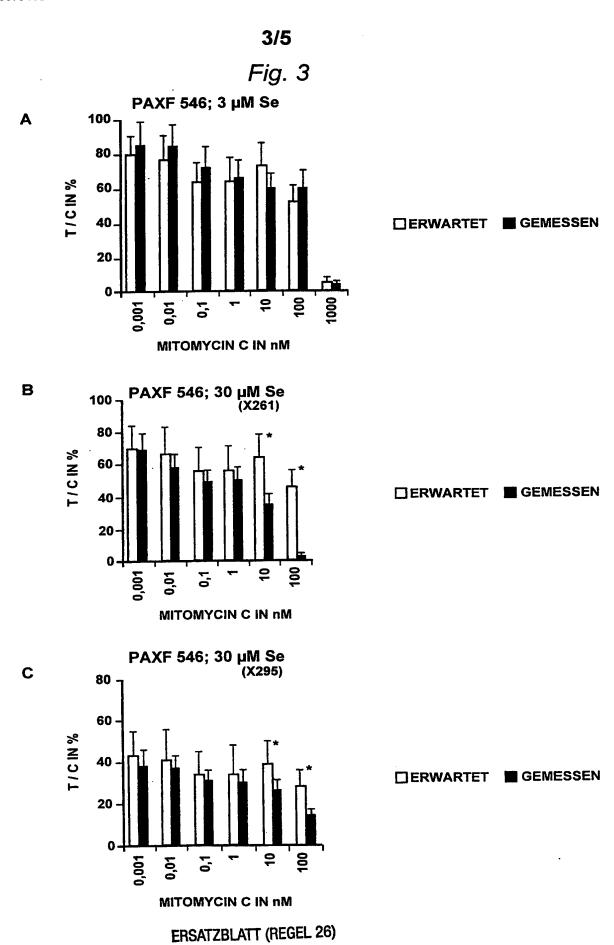
Fig. 2







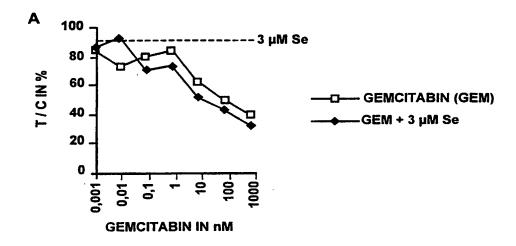
ERSATZBLATT (REGEL 26)

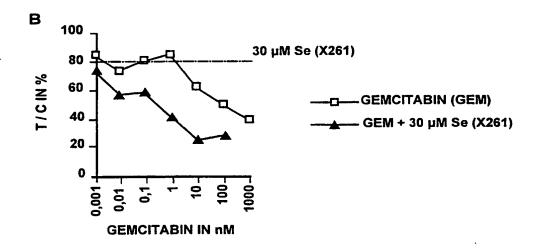


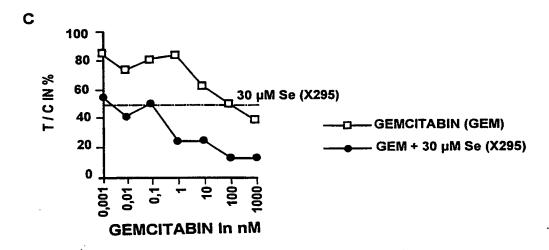
PCT/EP99/03771

4/5

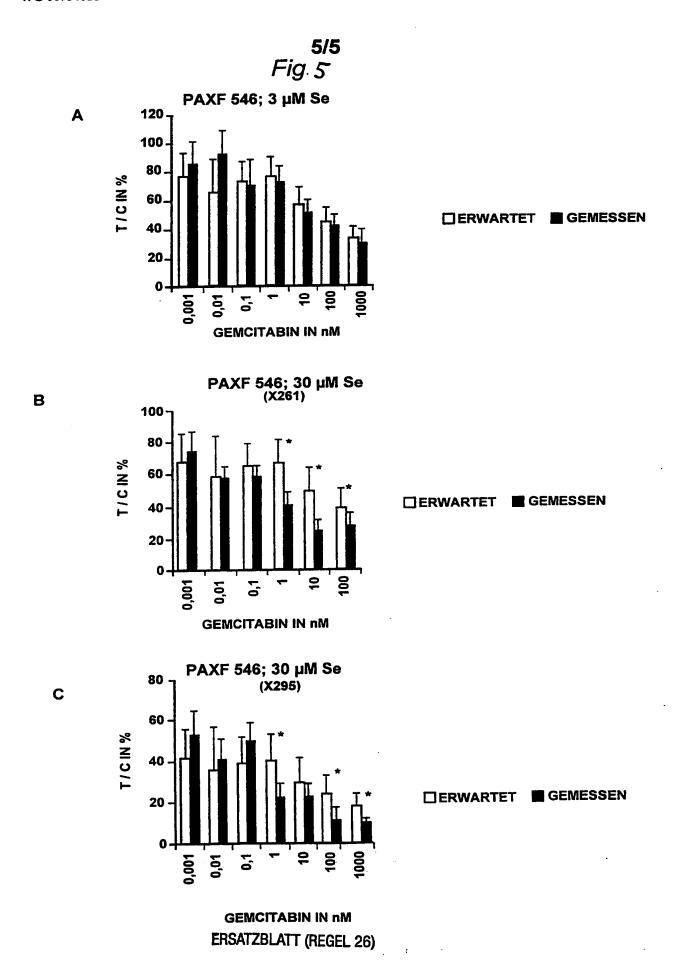
Fig. 4







ERSATZBLATT (REGEL 26)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intr vitonal Application No PC i'/EP 99/03771

a. classification of subject matter IPC 6 A61K33/04 A61k A61K31/495 A61K31/40 //(A61K33/04,31:40), (A61K33/04,31:495) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 **A61K** Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Relevant to claim No. Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages 1-27 DE 40 24 885 A (NATTERMANN A & CIE) X 13 February 1992 (1992-02-13) 1-27 abstract KRAMER K.: "'Antioxidants in oncology!. 1-27 X ANTIOXIDANZIEN IN DER ONKOLOGIE." DEUTSCHE ZEITSCHRIFT FUR ONKOLOGIE, (1994) 26/3 (76-83). , XP002116032 abstract 15-27 GUSTAFSON D L ET AL: "Inhibition of X mitomycin C's aerobic toxicity by the seleno -organic antioxidant PZ-51." CANCER CHEMOTHERAPY AND PHARMACOLOGY, (1991) 28 (3) 228-30. , XP002116033 1-27 abstract Patent family members are listed in annex. Further documents are listed in the continuation of box C. Special categories of cited documents: later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but "A" document defining the general state of the art which is not cited to understand the principle or theory underlying the considered to be of particular relevance invention "E" earlier document but published on or after the international "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such docu-"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or ments, such combination being obvious to a person skilled other means in the art. document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed "&" document member of the same patent family Date of the actual completion of the international search Date of mailing of the international search report 27/10/1999 21 September 1999 Authorized officer Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Herrera. S Fax: (+31-70) 340-3016

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intrational Application No
PCI/EP 99/03771

	C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Relevant to claim No.						
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages						
X	STRAMA H. ET AL: "'An interesting case from oncological practice!. DER INTERESSANTE FALL." ZEITSCHRIFT FUR ONKOLOGIE, (1997) 29/1 (24-25)., XP002116034 the whole document	1-27					
Y	KIREMIDJIAN-SCHUMACHER L. ET AL: "Regulation of cellular immune responses by selenium." BIOLOGICAL TRACE ELEMENT RESEARCH, (1992) 33/1 (23-35)., XP002116035 abstract	1-27					
Y	DOROSHOW J H ET AL: "Role of the glutathione-glutathione peroxidase cycle in the cytotoxicity of the anticancer quinones." PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS, (1990) 47 (3) 359-70. REF: 146, XP002116036 See page 366, summary	1-27					
Y	EP 0 750 911 A (LIFE SCIENCE LABS INC) 2 January 1997 (1997-01-02) claims 1,13	1-27					

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intrational Application No
PCT/EP 99/03771

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 4024885	A	13-02-1992	AT 171621 T	15-10-1998
			CA 2088760 A	01-02-1993
			DE 69130292 D	05-11-1998
			DE 69130292 T	08-04-1999
			WO 9202221 A	20-02-1992
			EP 0542807 A	26-05-1993
			ES 2123510 T	16-01-1999
			JP 5509309 T	22-12-1993
			US 5385726 A	31-01-1995
EP 0750911	Α	02-01-1997	NONE	نظم المادية والتي والتي الفقاة القالم التي والتي والتي التي والتي التي التي التي التي التي التي التي

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

PC | /EP 99/03771

. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES PK 6 A61K33/04 A61K31/495 A. KLASS //(A61K33/04,31:40), A61K31/40 (A61K33/04.31:495) Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 6 A61K Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile Betr. Anspruch Nr. Kategorie° 1-27 DE 40 24 885 A (NATTERMANN A & CIE) X 13. Februar 1992 (1992-02-13) 1-27 Zusammenfassung Y 1-27 KRAMER K.: "'Antioxidants in oncology!. X ANTIOXIDANZIEN IN DER ONKOLOGIE." DEUTSCHE ZEITSCHRIFT FUR ONKOLOGIE, (1994) 26/3 (76-83). , XP002116032 Zusammenfassung GUSTAFSON D L ET AL: "Inhibition of 15-27 X mitomycin C's aerobic toxicity by the seleno -organic antioxidant PZ-51." CANCER CHEMOTHERAPY AND PHARMACOLOGY, (1991) 28 (3) 228-30. , XP002116033 1-27 Zusammenfassung -/--Siehe Anhang Patentfamille Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen "A" Veröffentlichung, die den aligemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist Erfindung zugrundellegenden Prinzips oder der ihr zugrundellegenden Theorie angegeben ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft er-scheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahellegend ist soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung. eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derseiben Patentfamilie ist Absendedatum des internationalen Recherchenberichts Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 27/10/1999 21. September 1999 Bevoilmächtigter Bediensteter Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo ni, Herrera, S Fax: (+31-70) 340-3016

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlich

an, die zur seiben Patentfamilie gehören

Intentionales Aktenzeichen
PCI/EP 99/03771

im Recherchenberich ngeführtes Patentdoku		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
DE 4024885		13-02-1992	AT CA DE DE WO EP ES JP US	171621 T 2088760 A 69130292 D 69130292 T 9202221 A 0542807 A 2123510 T 5509309 T 5385726 A	15-10-1998 01-02-1993 05-11-1998 08-04-1999 20-02-1992 26-05-1993 16-01-1999 22-12-1993 31-01-1995
EP 0750911	Α	02-01-1997	KEINE		

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

int ationales Aktenzeichen
PCI/EP 99/03771

Kategorie*	ung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	STRAMA H. ET AL: "'An interesting case from oncological practice!. DER INTERESSANTE FALL." ZEITSCHRIFT FUR ONKOLOGIE, (1997) 29/1 (24-25)., XP002116034 das ganze Dokument	1-27
Y	KIREMIDJIAN-SCHUMACHER L. ET AL: "Regulation of cellular immune responses by selenium." BIOLOGICAL TRACE ELEMENT RESEARCH, (1992) 33/1 (23-35)., XP002116035 Zusammenfassung	1-27
Y	DOROSHOW J H ET AL: "Role of the glutathione-glutathione peroxidase cycle in the cytotoxicity of the anticancer quinones." PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS, (1990) 47 (3) 359-70. REF: 146, XP002116036 See page 366, summary	1-27
Y	EP 0 750 911 A (LIFE SCIENCE LABS INC) 2. Januar 1997 (1997-01-02) Ansprüche 1,13	1-27